

Regulación de la expresión de lamina A/C en la célula T y su papel en la diferenciación de CD4⁺ *naïve* a célula efectora

Alberto Del Monte Monge^{1,2*}, Marta Blanco Berrocal², José María González Granado², Vicente Andrés².

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **2** Departamento de Epidemiología, Aterotrombosis e Imagen, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), 28029 Madrid, España.

Resumen

La lamina A/C es una proteína nuclear con funciones estructurales y de regulación de la señalización celular y la transcripción de genes pero no se ha estudiado en detalle su papel en el sistema inmune. Los linfocitos T CD4⁺ *naïve* reconocen un antígeno presentado por una célula presentadora de antígeno (APC), se activan, proliferan y se diferencian a células efectoras para llevar a cabo funciones de respuesta inmune adaptativa. En la activación del linfocito T se producen eventos de señalización celular y transcripción de genes. Estudios previos en el laboratorio han mostrado que la lamina A/C se expresa en el linfocito T tras el reconocimiento de un antígeno para regular el grado de activación posterior del linfocito T. Como continuación, en este estudio se ha pretendido conocer las vías de señalización implicadas en la expresión de lamina A/C en el linfocito T así como establecer un posible papel de la lamina A/C en el proceso de diferenciación del linfocito T *naïve* a célula T efectora (Th). Para ello, con técnicas de citometría e inmunofluorescencia se ha analizado la expresión de lamina A/C en células T CD4⁺ de ratón estimulados a diferentes tiempos con y sin inhibidores de diferentes vías de señalización. Estos experimentos han mostrado una expresión transitoria de lamina A/C con un máximo a un día tras la estimulación así como un posible papel las vías de Src quinasas y de MAPK: ERK1/2 y p38 en esta inducción. El análisis por citometría de ensayos de activación, proliferación y diferenciación *in vitro* de células T CD4⁺ *naïve* de ratones WT y deficientes en lamina A/C ha mostrado que la lamina A/C tiene un papel fundamental en el proceso de diferenciación de la célula T CD4⁺ *naïve* a Th1.

Palabras clave: Lamina A/C, linfocito T, diferenciación, proliferación, activación.

Cita: Del Monte A, Andrés V, González J M (2013) Regulación de la expresión de lamina A/C en la célula T y su papel en la diferenciación de CD4⁺ *naïve* a célula efectora. *Dianas* 2(2): e20130902. ISSN 1886-8746 journal.dianas.20130902 URI <http://dspace.uah.es/dspace/handle/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 27 de junio de 2013

Copyright: © 2013 Del Monte et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es_ES

***E-mail:** a.delmontemonge@gmail.com



Introducción

La envoltura nuclear tiene tres componentes principales: membranas nucleares interna y externa, poros nucleares, y lámina nuclear. Esta última está mayoritariamente compuesta por las laminas de tipo A y de tipo B que forman redes en el interior del núcleo e interaccionan con la membrana nuclear interna y la cromatina. El gen *LMNA* codifica para las laminas de tipo A siendo la lamina A y la lamina C las proteínas mayoritarias [1-3]. En nuestro estudio nos centraremos en estas proteínas y las denominaremos en conjunto como lamina A/C. La función más conocida de la lamina A/C es el mantenimiento de la estabilidad mecánica del núcleo, pero también interviene en procesos de síntesis de ADN, respuesta a daño del ADN, organización de la cromatina, transcripción de genes, y proliferación, diferenciación y migración celular [1, 3]. Se ha constatado la expresión de lamina A/C de forma ubicua en células somáticas [3], sin embargo, su presencia y función en el sistema inmune permanece aún poco estudiada ya que solo se ha descrito un papel de la lamina A/C en el desarrollo de las células del sistema inmune pero producido por la expresión de lamina A/C en las células del estroma de los órganos linfoides y no por la expresión de la lamina A/C en las células del sistema inmune [4]. Sobre un posible papel de la lamina A/C en las funciones de las células del sistema inmune, estudios previos en el laboratorio han mostrado que la lamina A/C se expresa en el linfocito T tras reconocer un antígeno y que esta proteína es capaz de regular el grado de activación posterior del linfocito T. La entrada de agentes patógenos en los

organismos desencadena una respuesta inmunológica que implica una serie de moléculas y células efectoras que en una primera fase, menos específica, es denominada respuesta innata y en una segunda, muy específica, es denominada inmunidad adaptativa. La inmunidad adaptativa requiere la presentación de antígenos por las células dendríticas (DC) a las células T, lo que lleva a la expansión clonal y activación de células Th (helper CD4⁺) y linfocitos T citotóxicos (CD8⁺). Se conocen al menos 4 subtipos de células Th: Th1, Th2, Th17 y Treg [5]. Las células Th1 potencian la eliminación de patógenos intracelulares y están definidas por su capacidad de producir IFN- γ e IL-2 entre otras citoquinas. Las células Th2 controlan la infección de patógenos extracelulares y producen IL-4, IL-5 e IL-13. Ambos subtipos celulares están asociados con la patogénesis autoinmune en los que existe una respuesta Th desproporcionada o de fenotipo inadecuado. En concreto, las células Th1 se han asociado al origen de varias enfermedades inflamatorias y autoinmunes crónicas como la esclerosis múltiple y la artritis [6] mientras que las células Th2 se han asociado a condiciones alérgicas e inflamatorias mediadas por anticuerpos como el asma [7-8]. Una respuesta inmune adecuada requiere la activación concertada de las células B y T, que debe estar bien regulada para garantizar la eficacia, la especificidad y la memoria. Para conocer en mayor profundidad como se activa y amplifica el sistema inmune es necesario un entendimiento detallado de las interacciones celulares y moleculares que controlan la orientación y al migración dirigida de los leucocitos y de las diferentes moléculas y pasos que intervienen en la formación de la sinapsis inmunológica. Hasta el momento se ha descrito que la formación de la sinapsis inmunológica en la formación de conjugados entre linfocitos T y células presentadoras de antígeno (APCs) conllevan proceso de segregación de proteínas de membrana y activación de cascadas de señalización intracelulares, conducidos por la reorganización de microdominios de membrana, estos eventos son acompañados por procesos de activación de moléculas reguladoras y de señalización a nivel local y cambios en los componentes del citoesqueleto que incluyen la actina y la miosina [9]. Los objetivos de este estudio han sido intentar conocer las vías de señalización implicadas en la expresión de lamina A/C en el linfocito T tras el reconocimiento de un antígeno y establecer un posible papel de la lamina A/C en el proceso de diferenciación del linfocito T *naïve* a célula T efectora (Th).

Métodos

Ratones

En este estudio se han empleado dos modelos de ratón. Ratones deficientes en la expresión de la lamina A/C (LAKO) y sus respectivos controles WT y un segundo modelo de ratones que carecen de la lamina A/C y además llevan 2 transgenes para expresar un TCR específico en la células CD4⁺ que reconozcan el péptido 323-339 de OVA en el contexto de I-A^b (OTII/LAKO)

Aislamiento de esplenocitos, estimulación y uso de inhibidores de vías de señalización

Tras la extracción de bazo de ratones WT se realizó un procesamiento de los mismos para el aislamiento y cultivo de los esplenocitos en medio RPMI 1614 con 10% FBS a 37°C. Para la activación de los mismos se empleó la combinación de anticuerpos (anti-ratón) frente a CD3 (5 μ g/ml unido a placa) y a CD28 (2 μ g/ml en suspensión) o la lectina de origen vegetal concanavalina A (5 μ g/ml). En los ensayos de activación se recogieron muestras sin estimular (tiempo 0) y a 1, 2 y 3 días de estimulación. Para los ensayos de inhibición de las vías de señalización se emplearon los inhibidores SB203580 (5 μ M, que inhibe p38), PD98059 (50 μ M, que inhibe MEK1), U0126 (20 μ M, que inhibe MEK1/2), PP2 (5 nM, que inhibe lck y fyn) y SP600125 (20 μ M, que inhibe JNK quinasa) que fueron añadidos 30 minutos antes de la estimulación. Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 2% + sacarosa al 1%.

Activación, proliferación y diferenciación *in vitro*

Se procesaron bazo de ratones WT, LAKO, LAKO/OTII, para la obtención de esplenocitos y, en algunos casos, de linfocitos T CD4⁺ aislados mediante el uso de anticuerpos anti CD4⁺ unidos a biotina, bolas magnéticas con estreptavidina y columnas magnéticas. En los ensayos de activación se cultivaron linfocitos T CD4⁺ aislados en presencia de anticuerpo CD3 y CD28, a las 24 se analizó la expresión de CD69 y CD25 como marcadores de activación por citometría. En los ensayos de proliferación, las células fueron teñidas con el marcador celular CFSE (5mM) durante 10 min a 37°C. A continuación se cultivaron esplenocitos aislados en presencia de anticuerpo anti-CD3 y CD28 hasta los 5 días donde se analizó el grado de pérdida de fluorescencia por citometría. En los ensayos de diferenciación se cultivaron esplenocitos aislados en presencia de anticuerpo CD3 y CD28 o en presencia de APCs + OVA, a los 6 días se analizaron las poblaciones positivas para IFN γ como marcador de diferenciación Th1 por citometría.

Citometría

Las células fueron fijadas con PFA 2%/1% sacarosa e incubadas en placas multipocillo con anticuerpos anti-ratón conjugados con moléculas fluorescentes: anti-CD69-FITC, anti-CD25-APC, anti-CD25-Biotina, anti-CD4-PE, anti-CD4-V450, anti-CD8-Alexa647, anti-IL4-PE y anti-IFN γ -APC a una dilución 1/100 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras con anticuerpo anti-CD25-Biotina, se

incubaron con estreptavidina-V450 a una dilución 1/300 durante 1 hora a temperatura ambiente. Para el marcaje de la lamina A/C, tras la permeabilización de la célula con Triton X100 durante 5 minutos a temperatura ambiente las muestras fueron incubadas con anticuerpo anti-lamina A/C-Alexa488 a una dilución 1/100 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células fueron analizadas por citometría de flujo con un citómetro FACSFortessa. Para cuantificar la expresión de las diferentes moléculas se determinó la mediana de la intensidad de fluorescencia de los experimentos de citometría de células tratadas y analizadas en las mismas condiciones obteniéndose unidades arbitrarias.

Resultados

Estimulación de la expresión de lamina A/C

En este experimento se estimuló el TCR de esplenocitos de ratones WT con anticuerpos anti-CD3/CD28 o concanavalina A y se recogieron muestras a varios días. Las muestras se tiñeron con anti-CD4-PE, anti-CD25-Biotinilado-streptavidina-V450 y lamina A/C-Alexa488. Las células se analizaron por citometría de flujo seleccionando la población de células CD4⁺ y se realizaron histogramas representando la expresión de lamina A/C y de CD25, con el objetivo de medir la expresión de dichas moléculas en esta población. Los resultados mostraron que la estimulación de los linfocitos T con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Fig. 1A) o con concanavalina A (Fig. 1B) producían un incremento de la expresión de lamina A/C con una expresión máxima a 1 día tras la estimulación, además el análisis de la expresión en membrana de CD25 confirmó la activación de las células T tras las estimulación (Fig.1 C-D).

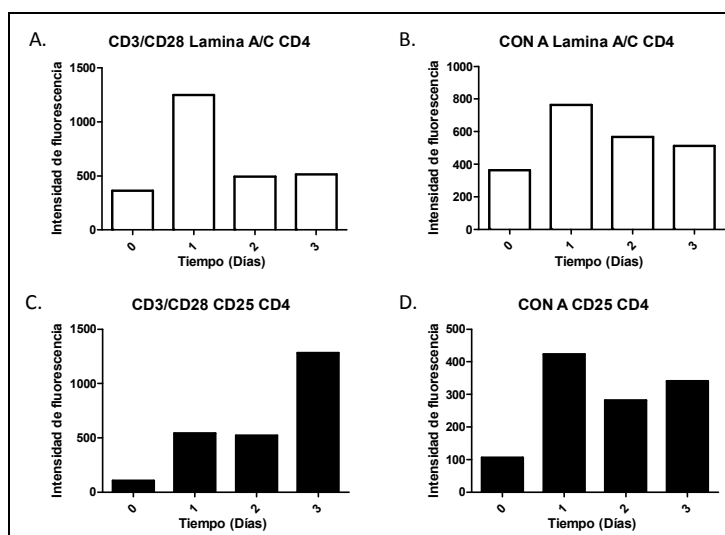


Figura 1.-La estimulación del TCR del linfocito T induce la expresión de lamina A/C. Esplenocitos de ratones WT fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3/CD28 (CD3/CD28) (A-C) o con concanavalina A (CONA) (B-D). Se analizó por inmunofluorescencia y citometría la expresión de CD25 en membrana, como marcador del grado de activación y de lamina A/C. Las gráficas muestran la mediana de la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias de los diferentes marcajes en un análisis realizado por citometría.

Efecto de inhibidores de vías de señalización en la expresión de lamina A/C

Una vez determinado que existe un pico máximo de producción de lamina A/C a 24 horas se utilizó la preincubación de las células con diferentes inhibidores farmacológicos para determinar las vías de señalización que pudieran estar implicadas en la inducción de lamina A/C midiendo la expresión de lamina A/C a 24 horas. Para ello, los esplenocitos derivados de ratones WT se incubaron durante 30 minutos con distintos inhibidores de algunas rutas de señalización celular que se activan en el linfocito T tras el reconocimiento de un antígeno. A continuación se estimularon las células con anticuerpos anti-CD3/CD28 o concanavalina A, 24 horas después las muestras se recogieron y se tiñeron con anti-CD4-PE, anti-CD25-Biotinilado-streptavidina-V450 y lamina A/C-Alexa488. Las células se analizaron por citometría de flujo seleccionando la población de células CD4⁺ y se cuantificó la expresión de lamina A/C y CD25. Los resultados mostraron un aumento de la expresión de lamina A/C en los controles (Ref.) con respecto a tiempo 0 sin estimular (Fig. 1A-B), y un aumento de la expresión en membrana de CD25. La preincubación de las células con los distintos inhibidores produjo la reducción de la activación celular medida como la expresión de CD25 tras la estimulación tanto con anticuerpos como con concanavalina A (Fig. 2C-D) en diferentes magnitudes. La respuesta a los distintos inhibidores en la expresión de lamina A/C frente a los dos estímulos fue muy similar pero presentó ligeras diferencias. Concretamente, en los esplenocitos estimulados con anti-CD3/CD28 la inhibición con PP2, un inhibidor de la vías de Src quinasas que se encuentran cerca de la estimulación, produjo una menor producción de lamina A/C. La inhibición de la ruta MEK1 con PD98059 o U0126 también indujo una menor expresión de lamina A/C con respecto al control. Finalmente la inhibición de la ruta de p38 MAPK conlevó una menor producción

de lamina A/C a diferencia de la inhibición de la ruta de JNK MAPK que no conlleva ninguna reducción (Fig. 2A). En la estimulación con concanavalina A se observó en general una menor reducción de la producción de lamina A/C que con la estimulación con anticuerpos, siendo los inhibidores PD98059 y PP2 los únicos que produjeron un efecto en la producción de lamina A/C (Fig. 2B). Estos datos preliminares parecen indicar que las rutas de MAPK p38 y ERK1/2 así como la señalización por las quinasas tipo Src podría tener un papel relevante en la inducción de la síntesis de lamina A/C tras la activación del linfocito T por el reconocimiento de un antígeno (Fig. 3).

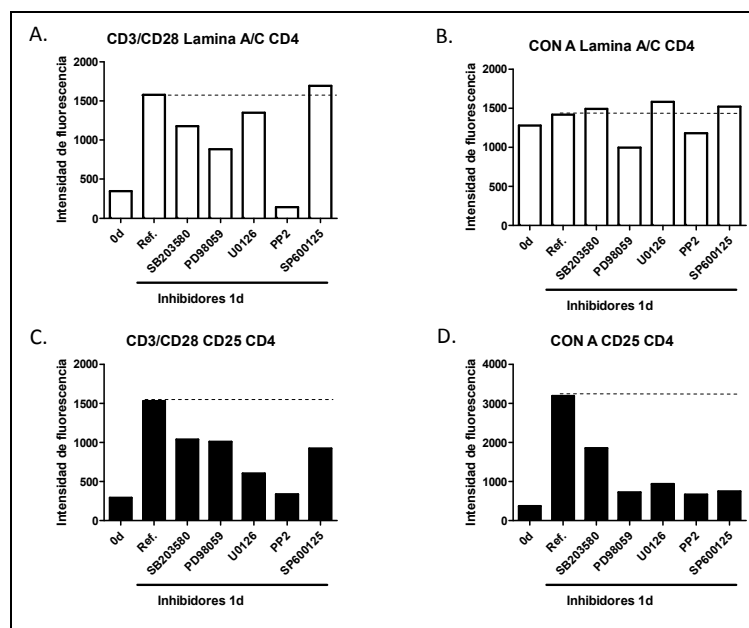


Figura 2.- La inhibición de las vías de señalización de ERK1/2, p38 MAPK y las quinasas Src pero no de la vía de JNK reduce la producción de lamina A/C tras la activación de la célula T. Esplenocitos de ratones WT fueron incubados con inhibidores de las rutas de señalización indicadas y estimulados con anticuerpos anti-CD3/CD28 (CD3/CD28) (A-C) o con concanavalina A (CONA) (B-D). Se analizó por inmunofluorescencia y citometría. La expresión de CD25 en membrana como marcador del grado de activación y se cuantificó la expresión de lamina A/C. Las gráficas muestran la mediana de la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias de los diferentes marcajes en un análisis realizado por citometría.

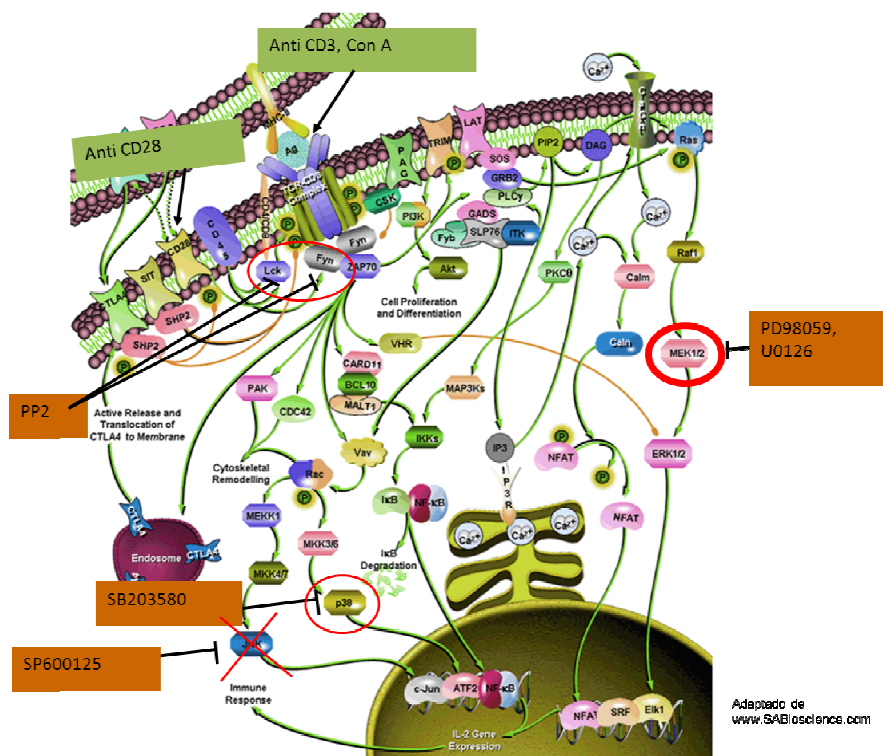


Figura 3.- Las vías de señalización de ERK1/2, p38 MAPK y las quinasas Src pero no la vía de JNK parecen estar implicadas en la producción de lamina A/C tras la activación de la célula T. Esquema de la señalización celular producida en una célula T tras el reconocimiento de un antígeno. El esquema muestra los distintos estímulos (cuadros

verdes) e inhibidores usados (cuadros naranjas). Los círculos rojos representan las posibles moléculas y vías implicadas en la expresión de lamina A/C y la cruz roja representa la vía descartada en este proceso.

Activación, proliferación y diferenciación *in vitro*

El siguiente objetivo fue dilucidar el posible papel de la lamina A/C en el proceso de diferenciación de la célula T CD4⁺ *naïve* a célula efectora. Este proceso conlleva la activación, proliferación y diferenciación de la célula T. Para determinar un posible papel de lamina en el proceso de activación se emplearon esplenocitos WT y LAKO que fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3/CD28 y que se recogieron a 1 día para su estudio. Las muestras se tiñeron con anti-CD69-FITC, anti-CD25-APC y anti-CD4-PE. Las células se analizaron por citometría de flujo seleccionando la población de células CD4⁺. Se realizaron histogramas de CD25 y CD69 para medir la expresión de dichas moléculas en la población CD4⁺ observándose una menor activación de las células T CD4⁺ procedentes de ratones LAKO con respecto a las células WT como muestra una menor expresión de CD69 y CD25 cuando lamina A/C no está presente (Fig. 4).

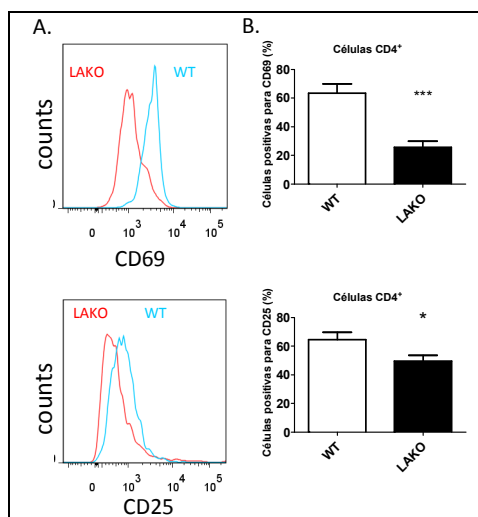


Figura 4.- Menor activación de las células T CD4⁺ procedentes de ratones LAKO con respecto a las células WT. Linfocitos T CD4⁺ aislados de ratones WT y LAKO fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3/CD28. Se analizó por inmunofluorescencia y citometría. La expresión de CD25 y CD69 en membrana como marcador del grado de activación. Las gráficas muestran la mediana de la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias de los diferentes marcajes en un análisis realizado por citometría (A-B).

Para analizar el efecto de la ausencia de la lamina A/C en la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ se obtuvieron esplenocitos WT y LAKO que fueron teñidos con CFSE, un colorante que permanece en el interior celular y al dividirse la célula se reparte proporcionalmente entre las dos células hijas por lo que la acumulación del mismo pasa a estar reducida a la mitad lo que permite determinar el número de divisiones promedio que ha sufrido una célula tras la activación. Los esplenocitos se estimularon con anticuerpos anti-CD3/CD28 y se recogieron muestras a 0 días para determinar el grado de tinción de las células y a 5 días para cuantificar el número de divisiones. Las muestras se tiñeron con anti-CD4-PE. Las células se analizaron por citometría de flujo seleccionando la población de células CD4⁺. Se midieron las células de cada división seleccionando las distintas poblaciones de células positivas para CFSE. Los resultados obtenidos mostraron una menor proliferación de las células T CD4⁺ procedentes de ratones LAKO con respecto a las células WT como se observa en el perfil de la Fig. 5A donde se produce una reducción de la fluorescencia menor con respecto al tiempo inicial y como se ve en la Fig. 5B donde hay un número menor de células que han sufrido 3 divisiones.

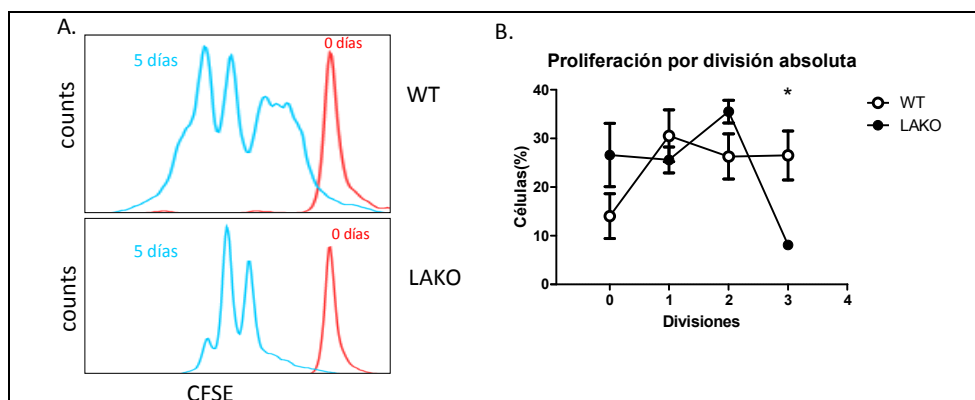


Figura 5.- Menor proliferación de células T $CD4^+$ procedentes de ratones LAKO con respecto a las células WT. Esplenocitos de ratones WT y LAKO fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3/CD28. Se analizó por inmunofluorescencia y citometría. Las gráficas muestran la fluorescencia de CFSE y el número de divisiones promedio.

Para determinar el efecto de la lamina A/C en la diferenciación de la célula T $CD4^+$ se utilizaron esplenocitos procedentes de dos modelos de ratón. Un ratón deficiente en lamina A/C y un ratón deficiente en lamina A/C que además es transgénico para expresar un TCR específico que reconoce un péptido de OVA. En estos experimentos, los esplenocitos WT y LAKO se estimularon con anticuerpos anti-CD3/CD28 mientras que los esplenocitos de ratones WT y LAKO/OTII del segundo ensayo se seleccionaron en una columna magnética para el aislamiento de células $CD4^+$. Para la estimulación de las células $CD4^+$ WT/OTII y LAKO/OTII se incubó la fracción negativa de las células WT (APCs entre otras) con el péptido específico de OVA antes de su adición a las células T $CD4^+$ WT/OTII o LAKO/OTII. Las células fueron recogidas a 6 días después de la estimulación y fueron teñidas con anti-CD4-V450, anti-IL4-PE y anti-IFN γ -APC. Las células se analizaron por citometría de flujo seleccionando la población de células $CD4^+$ observándose que la ausencia de lamina A/C condicionaba la diferenciación celular porque los porcentajes de células positivas para IFN γ estaban reducidos con respecto a las células control tanto en células procedentes de ratones LAKO (Fig. 6) como en células procedentes de ratones LAKO/OTII. (Fig. 7).

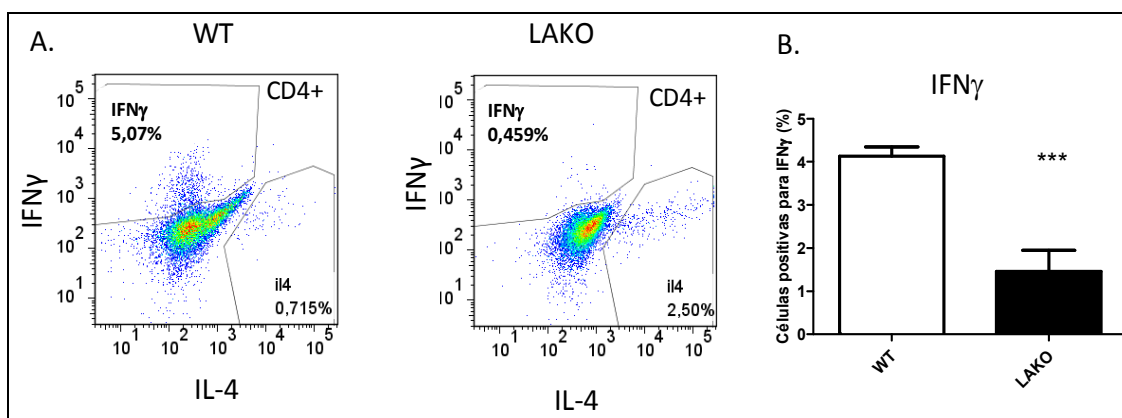


Figura 6.- Disminución de la respuesta Th1 en los ratones LAKO con respecto al WT. Esplenocitos de ratones WT y LAKO fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3/CD28. Se analizó por inmunofluorescencia y citometría. IFN γ como citoquina marcadora de respuesta Th1. Las gráficas muestran el porcentaje de células positivas para IFN γ .

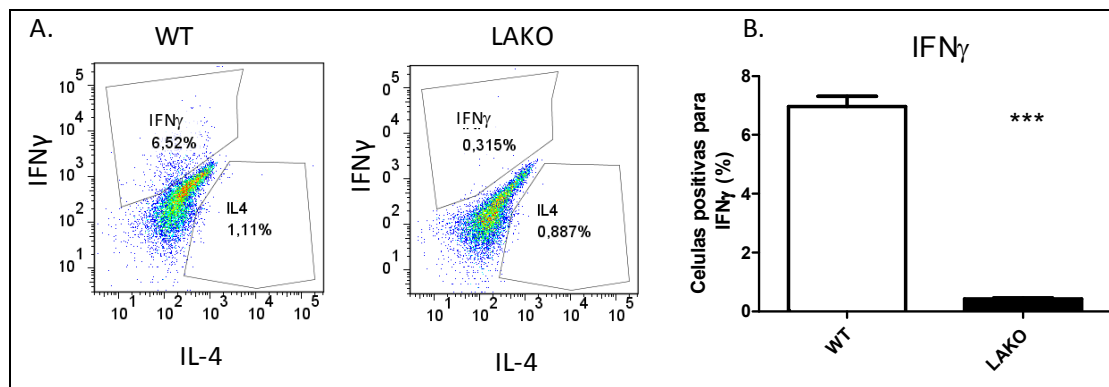


Figura 7.- Disminución de la respuesta Th1 en los ratones LAKO (OTII) con respecto al WT (OTII). Esplenocitos de ratones WT (OTII) y LAKO (OTII) fueron estimulados con APCs + OVA. Se analizó por inmunofluorescencia y citometría. IFN γ como citoquina marcadora de respuesta Th1. Las gráficas muestran el porcentaje de células positivas para IFN γ .

Discusión

Existen pocos trabajos publicados que muestren un papel de la lamina A/C en el sistema inmune, Hale y cols. mostraron que la lamina A/C de las células del estroma de los órganos linfoides tenía un papel sobre el desarrollo de las células del sistema inmune, siendo este efecto extrínseco [4]. No existen, sin embargo publicaciones que muestren un papel de la lamina A/C en las propias células del sistema inmune, en este sentido estudios previos realizados en mi laboratorio de acogida han mostrado que la lamina A/C está presente en células del sistema inmune propiamente dichas, que se induce tras la activación del linfocito T $CD4^+$ y que juega un papel importante en la regulación de la activación de la célula T tras el reconocimiento de un antígeno. Basado en estos resultados y en el interés que podría tener el conocimiento del papel de la lamina A/C en la diferenciación del linfocito T tras su activación por el

reconocimiento de un antígeno en procesos inflamatorios este proyecto se centró en determinar el rol de la lamina A/C en la diferenciación del linfocito T. También de interés podría ser el conocimiento de los mecanismos que regulan la inducción de la lamina A/C en el linfocito T por su particularidad frente a otros tipos celulares donde no se ha descrito una inducción de la producción de esta proteína tan rápida y de forma transitoria. Los resultados obtenidos de la inducción de la expresión de lamina A/C demostraron que tras su activación, el linfocito T CD4⁺ aumenta sus niveles de lamina A/C de forma transitoria. Cuando se utilizaron los diversos inhibidores de las distintas rutas de activación, se observó que tras el uso de algunos de ellos y después de la estimulación, el aumento de la expresión de lamina A/C no fue tan acusado, el uso de otros inhibidores sin embargo no produjo efecto alguno en los niveles de lamina A/C. En el caso de los esplenocitos estimulados con anticuerpos anti-CD3/CD28 los inhibidores que parecían tener efecto fueron los de la vía de las MAPK (ERK y p38), y el de la vía Src (Lck y Fyn). En el caso de los esplenocitos estimulados con concanavalina A los inhibidores que afectaron a la expresión de lamina A/C fueron uno de la vía de las MAPK (ERK) y el de la vía Src. Estos resultados parecen indicar que las dos vías implicadas en la regulación de la expresión de lamina A/C tras la estimulación de la célula T son la de las MAPK (ERK y p38) y la de Src, mientras que la vía de JNK no parece tener relación directa con la expresión de lamina A/C tras la activación del linfocito T por la estimulación del TCR, ya que la expresión de lamina no se vio afectada por este inhibidor en ninguno de los casos. Los resultados obtenidos en nuestro estudio completan los descritos previamente en la bibliografía que dicen que la expresión de lamina A/C está regulada por la vía de Akt en las líneas celulares de mioblastos de ratón C2C12 y en células epiteliales de riñón embrionario humano HEK-293 en el proceso de división celular [10]. Nuestros experimentos aportan la novedad de tratarse de un tipo celular diferente y de implicar otras vías de señalización en la inducción de lamina A/C. No obstante sería de interés estudiar el efecto de inhibidores de la vía de Akt en la expresión de lamina A/C en el linfocito ya que esta vía de transducción de señales también se activa tras la ligación del TCR en el linfocito T. Para completar nuestros estudios habrá que realizar ensayos con inhibidores de otros niveles de las rutas implicadas así como utilizar combinaciones de inhibidores por la posibilidad de interacciones entre las distintas rutas de señalización. Además se podría utilizar la sobreexpresión de proteínas que hiperactiven o inhiban estas rutas de señalización como son el caso de los mutantes MEKE y MEKA de la ruta de ERK1/2 [11]. También será de interés estudiar el promotor de la lamina A/C para determinar posibles factores de transcripción que se unan al gen de la lamina A/C y comprobar el comportamiento de estos factores tras la activación de la célula T y como las diferentes vías de señalización afectan a su función y posiblemente a la expresión de lamina A/C. Datos obtenidos en el laboratorio muestran que la lamina A/C en un potenciador de la activación de la activación del linfocito T, por este motivo es posible que el linfocito T no exprese de forma constitutiva a la lamina A/C y la exprese de forma temporal ya que podría suponer una hiperactivación de la célula T. Si existieran defectos en la expresión de lamina A/C en los linfocitos T podría ser posible que este hecho pudiera estar relacionado con el origen o el mantenimiento de enfermedades inmunes. Con relación con la implicación de la lamina A/C en la diferenciación del linfocito T CD4⁺ los resultados de activación tras estimulación de esplenocitos con anticuerpos anti-CD3/CD28 mostraron que las células T CD4⁺ de ratones LAKO se activan en menor medida que las células WT. Los resultados de proliferación tras estimulación de esplenocitos con anticuerpos anti-CD3/CD28 mostraron que las células T CD4⁺ de ratones LAKO proliferan en menor medida que las células WT. Esto indica un papel importante de la lamina A/C en estos dos procesos celulares. Los resultados de diferenciación tras estimulación de esplenocitos con anticuerpos anti-CD3/CD28 mostraron que el porcentaje de células T CD4⁺, positivas para IFN γ era menor en ratones LAKO que en ratones WT. Los resultados de diferenciación tras estimulación de esplenocitos con APCs + OVA mostraron que el porcentaje de células T CD4⁺, positivas para IFN γ era menor en ratones LAKO/OTII que en ratones WT/OTII. Al tomar la citoquina IFN γ como indicadora de respuesta Th1, se puede afirmar que hubo una disminución de la respuesta Th1 en los ratones LAKO con respecto al WT en ambos modelos de activación. Por lo tanto, se puede concluir que también existe un papel fundamental de la lamina A/C en este proceso inmune. Una célula T CD4⁺ *naïve* se estimula, se activa, prolifera y se diferencia, por lo tanto, con estos 3 experimentos en conjunto, se puede especular que la lamina juega un rol en la proceso global de diferenciación de la célula T CD4⁺ *naïve* a la célula efectora Th1. Futuros experimentos, deberán ir enfocados en dilucidar los mecanismos moleculares que producen que la lamina A/C actúe en este proceso del sistema inmune. De forma global, los resultados obtenidos en este proyecto podrían relacionar la expresión temporal de la lamina A/C con su papel en la diferenciación del linfocito T. Concretamente se ha observado una expresión transitoria de lamina A/C cuyo pico se da a las 24h, lo que implica que, es en ese intervalo de tiempo deberían de producirse los efectos de la lamina A/C en su papel en la diferenciación, tales como expresión de determinados genes o la producción de citoquinas. La producción de citoquinas necesarias para la diferenciación a Th1, podría ser uno de los puntos donde la expresión de lamina A/C podría estar actuando, ya que previamente hemos observado que la lamina A/C regula la producción y secreción de la IL-2 tras la activación de la célula T (experimentos previos del laboratorio), efecto que también podría tener sobre otras citoquinas esenciales en el proceso de diferenciación. Sería interesante medir los niveles de estas citoquinas a 24h para comprobar ésta hipótesis. Esta expresión máxima de lamina A/C a las 24 horas corresponde con un intervalo de tiempo en el que se ha observado que se producen cambios a nivel epigenético en la célula T CD4⁺ en proceso de

diferenciación que son mantenidos incluso sin la presencia de las citoquinas esenciales en este proceso. Este hecho apoya que la lamina A/C podría regular eventos iniciales en el proceso de diferenciación que fueran esenciales para el destino final de la célula. Como conclusión final, los resultados obtenidos en este trabajo muestran una función no descrita de la lamina A/C como regulador relevante en la diferenciación del linfocito T CD4⁺ *naïve* a linfocito Th y abre la posibilidad a la influencia de esta proteína en otros procesos de diferenciación que ocurren en el sistema inmune.

Agradecimientos

Quiero dar las gracias a José María González-Granado, Marta Blanco-Berrocal, a Vicente Andrés, al departamento de EAI y al laboratorio de FSM del CNIC.

Referencias

1. Andrés, V. and González, J. M. 2009. Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *J Cell Biol*, 187 (7), 945-57.
2. Burke, B. and Stewart, C. L. 2012. The nuclear lamins: flexibility in function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14 (1), 13-24.
3. Broers, J. L., Ramaekers, F. C., Bonne, G., Yaou, R. B. and Hutchison, C. J. 2006. Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev*, 86 (3), 967-1008.
4. Hale, J. S., Frock, R. L., Mamman, S. A., Fink, P. J. and Kennedy, B. K. 2010. Cell-extrinsic defective lymphocyte development in *Lmna*(-/-) mice. *PLoS One*, 5 (4), e10127.
5. Nakayama, T. and Yamashita, M. 2010. The TCR-mediated signaling pathways that control the direction of helper T cell differentiation. *Semin Immunol*, 22 (5), 303-9.
6. Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Peng, S. L. and Glimcher, L. H. 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*, 21, 713-58.
7. Zhu, J., Yamane, H. and Paul, W. E. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol*, 28, 445-89.
8. Reiner, S. L. 2007. Development in motion: helper T cells at work. *Cell*, 129 (1), 33-6.
9. Barreiro, O., De La Fuente, H., Mittelbrunn, M. and Sanchez-Madrid, F. 2007. Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol Rev*, 218, 147-64.
10. Bertacchini, J., Beretti, F., Cenni, V., Guida, M., Gibellini, F., Mediani, L., Marin, O., Maraldi, N. M., De Pol, A., Lattanzi, G., Cocco, L. and Marmioli, S. 2013. The protein kinase Akt/PKB regulates both prelamin A degradation and *Lmna* gene expression. *FASEB J*, 27 (6), 2145-55.
11. Gonzalez, J. M., Navarro-Puche, A., Casar, B., Crespo, P. and Andres, V. 2008. Fast regulation of AP-1 activity through interaction of lamin A/C, ERK1/2, and c-Fos at the nuclear envelope. *J Cell Biol*, 183 (4), 653-66.